ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพรอพอลิสจากจังหวัดน่าน

TOTAL PHENOLIC, FLAVONOID CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROPOLIS EXTRACTS FROM NAN PROVINCE

ภัทราพร ผูกคล้าย[1] และ ธัญญรัตน์ เชื้อสะอาด[2*]

Pattraporn Pukklay[1] and Thanyarat Chuesaard[2*]

[1]สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้–แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

[2]กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์พื้นฐาน มหาวิทยาลัยแม่โจ้–แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

[1]Applied Biology, Maejo University Phrae Campus

[2]Basic Science, Maejo University Phrae Campus

[*]corresponding author e–mail: thanyaratc@hotmail.com

(Received: 20 December 2020; Revised: 3 February 2021; Accepted: 5 February 2021)

บทคัดย่อ

พรอพอลิสเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดหนึ่งที่ได้จากผึ้งและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดพรอพอลิส โดยสกัดพรอพอลิสจากจังหวัดน่านด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล 70% และน้ำ นำสารสกัดมาศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Folin–Ciocalteu colorimetric assay วิธี Aluminium chloride colorimetric assay และวิธี DPPH radical scavenging assay ตามลำดับ รวมถึงวิเคราะห์สารสำคัญด้วยเทคนิค HPLC–DAD พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอล (EEP) มีค่าสูงกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 2.890±0.018 และ 1.849±0.017 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัมพรอพอลิส ตามลำดับ มีปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำ 0.616±0.005 และ 0.531±0.007 มิลลิกรัมสมมูลเควอซิตินต่อกรัมพรอพอลิส ตามลำดับ และพบว่า สารสกัดเอทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดน้ำ มีค่า IC_{50} ของสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำเท่ากับ 78.85 และ 246.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิสทั้งสองด้วยเทคนิค HPLC–DAD พบสารประกอบหลักที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ มีค่ารีเทนชันไทม์ 7.1 นาที ซึ่งอาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัด

พรอพอลิสโดยเฉพาะสารสกัดเอทานอลเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระที่อาจจะนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอางได้

คำสำคัญ: พรอพอลิส สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Propolis is one kind of natural substance produced by honeybees and exerts various pharmacological activities. The aim of this research was to determine total phenolic, flavonoid contents, antioxidant activity, and chemical compositions of propolis extracts. Propolis from Nan province was extracted by 70%v/v ethanol and water solvents. The extracts were determined for their total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity by using the Folin–Ciocalteu colorimetric assay, aluminium chloride colorimetric assay, and DPPH radical scavenging assay, respectively. The chemical compositions of propolis extracts were analyzed with high performance liquid chromatography–diode array detector (HPLC–DAD). The results showed total phenolic and flavonoid contents of ethanolic extract of propolis (EEP) were higher significantly than the water extract of propolis (WEP) ($p<0.05$). The total phenolic contents of EEP and WEP were 2.890±0.018 and 1.849±0.017 mg equivalent gallic acid per g of propolis, respectively. The flavonoid contents of EEP and WEP were 0.616±0.005 and 0.531±0.007 mg equivalent quercetin per g of propolis, respectively. Moreover, EEP had the higher efficiency to scavenge DPPH free radical than WEP, the IC_{50} values of EEP and WEP were 78.85 and 246.51 µg/ml, respectively. Analysis of propolis extracts by HPLC–DAD revealed the unidentical major compound at 7.1 minute retention time, which may have important biological activity. This study suggested that propolis extract, especially EEP is a source of antioxidant which might have the potential to use in drugs, dietary supplements, and cosmetics.

Keywords: Propolis, Phenolic compounds, Flavonoids, Free radical, Antioxidant

บทนำ

พรอพอลิส เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ได้จากผึ้ง โดยผึ้งเก็บยางเหนียวจากส่วนต่างๆ ของพืชนำมาผสมกับเอนไซม์ในน้ำลายของผึ้งและไขผึ้ง หน้าที่ของพรอพอลิส คือ ใช้ปิดรอยรั่วของรัง ใช้ห่อหุ้มศัตรูที่ตายภายในรังผึ้ง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเน่าเสียและป้องกันการติดเชื้อภายในรังผึ้ง องค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิส ประกอบด้วย ยางไม้ (resin) 50% ไข (Wax) 30% น้ำมันหอมระเหย (Essential oils) 10% เกสรดอกไม้ (Pollen) 5% และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ 5% (Easton–Calabria et al., 2019) พรอพอลิสมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเนื้องอก (Sun et al., 2015; Tiveron et al., 2016) องค์ประกอบทางเคมีของพรอพอลิสจะแตกต่างกัน ขึ้นกับภูมิประเทศ ภูมิอากาศ ชนิดของผึ้ง ชนิดของพืชที่ผึ้งเก็บยางเหนียวมาสร้างพรอพอลิสและฤดูกาล เป็นต้น ส่งผลให้พรอพอลิสแต่ละแหล่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน (ศิริวรรณ, 2551; Usman et al., 2016) ในปัจจุบันมีการนำพรอพอลิสมาใช้เป็นส่วนประกอบของยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอาง

อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นสารที่มีอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อยู่ในวงนอกของอะตอมหรือโมเลกุล ทำให้สารไม่เสถียร มีความว่องไวสูงในการเข้าทำปฏิกิริยา จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ และเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปเรื่อยๆ อนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์ของร่างกาย เป็นสาเหตุของการเกิดริ้วรอยก่อนวัย เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจและโรคหลอดเลือดหัวใจ (Ames et al., 1993) อนุมูลอิสระสามารถถูกกำจัดได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอลิก วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ เป็นต้น ในปัจจุบันสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติกำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เพราะเชื่อว่ามีความปลอดภัยกว่าสารสังเคราะห์

กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นสารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิสและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี มีงานวิจัยของประเทศไทยที่ศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิสจากแหล่งต่างๆ เช่น พรอพอลิสจากจังหวัดพะเยา (Khacha-ananda et al., 2013) พรอพอลิสจากจังหวัดเชียงราย ลำพูน น่าน พะเยา แพร่ (Sanpa et al., 2017) แต่การวิเคราะห์ชนิดของสารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิสของประเทศไทยยังมีข้อมูลน้อย เช่น งานวิจัยของ Siripatrawan et al. (2013) พบว่า รูติน (Rutin) เควอซิติน (Quercetin) และนารินจีนิน (Naringenin) เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในตัวอย่างพรอพอลิสของไทย งานวิจัยของ Kumazawa et al. (2004) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกของพรอพอลิสจาก 14 ประเทศ รวมถึงประเทศไทยด้วย และศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) เควอซิติน (Quercetin) แคมพ์เฟอรอล (Kaempferol) และคาเฟอิก แอซิด ฟีนิทิล เอสเทอร์ (Caffeic acid phenethyl ester; CAPE) ในพรอพอลิสแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก

จังหวัดน่านมีพื้นที่ทางการเกษตรจำนวนมากและการเลี้ยงผึ้งก็เริ่มเป็นที่สนใจของเกษตรกร อีกทั้งยังสามารถรวบรวมพรอพอลิสได้จำนวนมากเช่นกัน พรอพอลิสจากจังหวัดน่านได้ถูกอ้างถึงโดย Khacha-ananda et al. (2016) ว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ปริมาณสูง สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งได้ สอดคล้องกับงานของ Boonsai et al. (2014) พบการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรอพอลิสที่ทำในรูปกึ่งบริสุทธิ์ เป็นสารชนิดใหม่ คือ คาร์ดานอล (cardanol) มีสรรพคุณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ ดังนั้นพรอพอลิสและผลิตภัณฑ์จากผึ้ง *Apis mellifera* จึงน่าสนใจศึกษาต่อไป สารสกัดพรอพอลิสจากบราซิล เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะได้สาร CAPE พบว่า สารนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Banskota et al., 2002) และมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของไนตริกออกไซด์ (Nagaoka et al., 2003) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ได้จากพรอพอลิส เช่น เควอซิติน มีรายงานว่าการทดสอบกับเซลล์ไลน์ PC-3 และ DU-145 พบว่า ความเข้มข้นที่ 25 และ 50 ไมโครโมลาร์แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ทั้งสองชนิดได้ (Nair et al., 2015) สารกลุ่มกรดฟีนอลิก เช่น กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เป็นสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพราะโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีน ทำให้สามารถทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระได้

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ชนิดของสารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิสจากจังหวัดน่าน ประกอบด้วย กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เควอซิติน และ CAPE เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เครื่องสำอาง เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดเอทานอลของพรอพอลิส (EEP) และสารสกัดน้ำของพรอพอลิส (WEP)

เก็บตัวอย่างพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ในหมู่บ้านคือเวียง ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 ในบริเวณสวนลำไยซึ่งมีต้นไม้ชนิดต่างๆ เช่น ต้นลำไย ต้นมะม่วง ต้นขนุน ต้นกฤษณา สกัดสารตัวอย่างโดยชั่งพรอพอลิส จำนวน 10 กรัม บดละเอียดในไนโตรเจนเหลว นำมาสกัดด้วยตัวละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล 70%v/v และน้ำ อย่างละ 100 มิลลิลิตร เขย่าอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์

2. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds) ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu colorimetric method ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Singleton et al. (1999) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 0–8 ppm โดยนำสารสกัดพรอพอลิส ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 0.80 มิลลิลิตร เติม Folin–Ciocalteu reagent (เจือจาง 4 เท่า) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.4 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 5.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงผลเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของพรอพอลิส (mg GAE/g propolis) การวิเคราะห์สารตัวอย่าง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

3. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric method ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Chang et al. (2002) โดยใช้เควอซิตินเป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 0–15 ppm โดยนำสารสกัดพรอพอลิส ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 70%v/v ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร เติม 10% $AlCl_3.6H_2O$ ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1 โมลาร์ CH_3COOK ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 2.80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และหาปริมาณฟลาโวนอยด์จากกราฟมาตรฐานของเควอซิติน และแสดงผลออกมาเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิตินต่อกรัมของพรอพอลิส (mg QE/g propolis) การวิเคราะห์สารตัวอย่าง ทำซ้ำ 3 ครั้ง

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ WoŹniak et al. (2019) โดยนำสารสกัดพรอพอลิส EEP และ WEP จำนวน 7 ความเข้มข้น ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 70%v/v ปริมาตร 2.10 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.60 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้สารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้น 25 50 100 200 300 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยมีกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นสารควบคุมเชิงบวก (Positive control) ในการเปรียบเทียบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์สารตัวอย่าง ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการที่ 1

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH = $\frac{[A_{control}-(A_{sample}-A_{blank})]}{A_{control}}$ x 100 (1)

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ประกอบด้วย เอทานอลและสารละลาย DPPH

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ประกอบด้วย สารสกัดพรอพอลิสและสารละลาย DPPH

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ประกอบด้วย สารสกัดพรอพอลิสและเอทานอล

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารสกัดพรอพอลิส

5. การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิส ด้วยเทคนิค HPLC–DAD

สารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิสเป็นสารในกลุ่มกรดฟีนอลิก (Phenolic acids) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ประกอบกับสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีและมักจะพบในพรอพอลิส คือ กรดคาเฟอิก เควอซิติน และ CAPE (Kumazawa et al., 2004) ในงานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์สาร 5 ชนิด ประกอบด้วย กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เควอซิติน และ CAPE โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีตัวตรวจวัดแบบไดโอดอาร์เรย์ (HPLC–DAD) สภาวะการทำงานของระบบ HPLC ดัดแปลงมาจากวิธีของ Widjaja et al. (2008) โดยสารมาตรฐานหรือสารสกัดพรอพอลิสจะนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น Agilent 1260 ใช้คอลัมน์ชนิด ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, USA) ใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด ประกอบด้วย เฟสเคลื่อนที่ A คือ อะซิโตไนไตรล์ และเฟสเคลื่อนที่ B คือ สารละลายกรดอะซิติก 0.4%v/v ทำการชะแบบเกรเดียน (ในช่วง 2 นาทีแรกใช้ 15%A เพิ่มขึ้นเป็น 80%A ในช่วง 7 นาทีถัดมา เพิ่มขึ้นเป็น 100%A ในช่วง 2 นาทีต่อมา คงไว้ที่ 100%A นาน 6 นาที ปรับลดลงเป็น 15%A ในช่วง 1 นาที และคงไว้ที่ 15%A เป็นเวลา 5 นาที) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรของสารที่ฉีด 5 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร สำหรับกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และ CAPE และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร สำหรับเควอซิติน เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานผสม ความเข้มข้น 10 20 40 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมไมโครซอฟต์เอ็กเซล เวอร์ชัน 2013 สำหรับค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การทดสอบทางสถิติใช้ Student's t–test ด้วยโปรแกรม SPSS version 20 ในการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ระหว่างสารสกัด EEP และ WEP

ผลการวิจัย

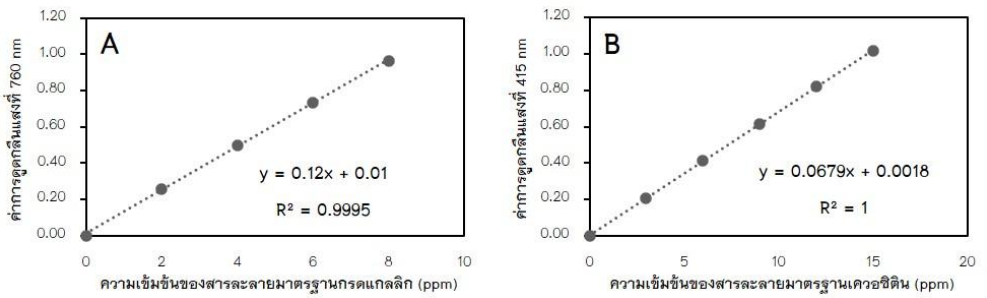
พรอพอลิสจากจังหวัดน่านที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ มีลักษณะเป็นยางข้นเหนียว สีน้ำตาลเข้มจนเกือบเป็นสีดำและไม่มีกลิ่น เมื่อนำพรอพอลิสมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอล 70%v/v และน้ำ พบว่า สารสกัดเอทานอลของพรอพอลิส (EEP) มีสีเหลืองใส สารสกัดน้ำของพรอพอลิส (WEP) มีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) และคำนวณหาผลผลิตร้อยละ (%yield) ของสารสกัดเอทานอล 70%v/v และน้ำ มีค่า 9.80 และ 9.10 ตามลำดับ

1. การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดพรอพอลิส คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่มีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.12x + 0.01$ และ ค่า $R^2 = 0.9995$ ดังภาพที่ 1(A) รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมพรอพอลิส (mg GAE/g propolis) พบว่า สารสกัดพรอพอลิสทั้งสองชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 1 โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอล (EEP) มีค่า 2.890±0.018 mg GAE/g propolis ซึ่งสูงกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 1.849±0.017 mg GAE/g propolis

2. การศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์

การศึกษาหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพรอพอลิส คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของเควอซิติน ที่มีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.0679x + 0.0018$ และ ค่า $R^2 = 1$ ดังภาพที่ 1(B) รายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิตินต่อกรัมพรอพอลิส (mg QE/g propolis) พบว่า สารสกัดพรอพอลิสทั้งสองชนิดมีปริมาณฟลาโวนอยด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 1 โดยปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอล (EEP) และสารสกัดน้ำ (WEP) มีค่า 0.616±0.005 และ 0.531±0.007 mg QE/g propolis ตามลำดับ



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย A = สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก และ B = สารละลายมาตรฐานเควอซิติน

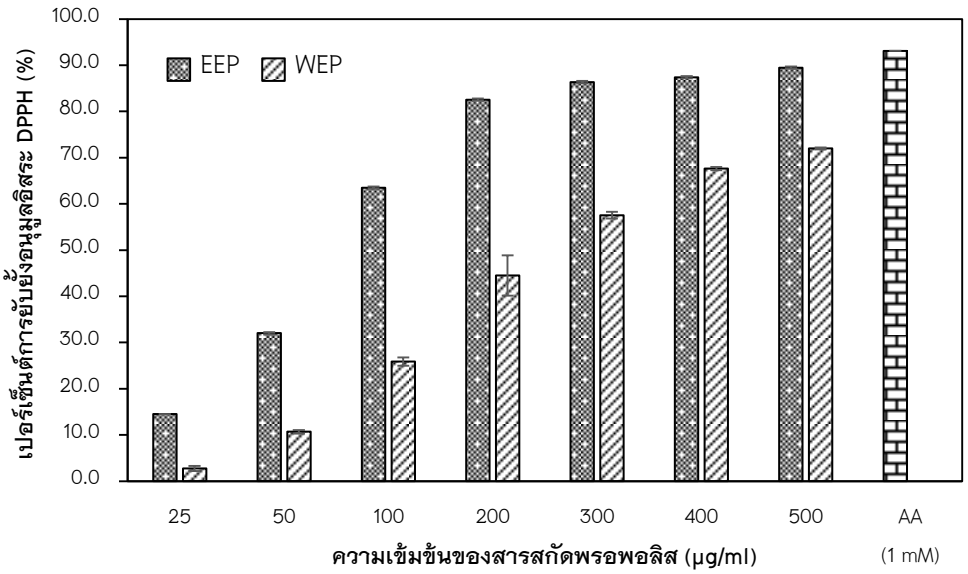
ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดพรอพอลิส

สารสกัดพรอพอลิส	ปริมาณฟีนอลิก (mg GAE/g propolis)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g propolis)
สารสกัดเอทานอล (EEP)	2.890±0.018[a]	0.616±0.005[a]
สารสกัดน้ำ (WEP)	1.849±0.017[b]	0.531±0.007[b]

หมายเหตุ อักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$), ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

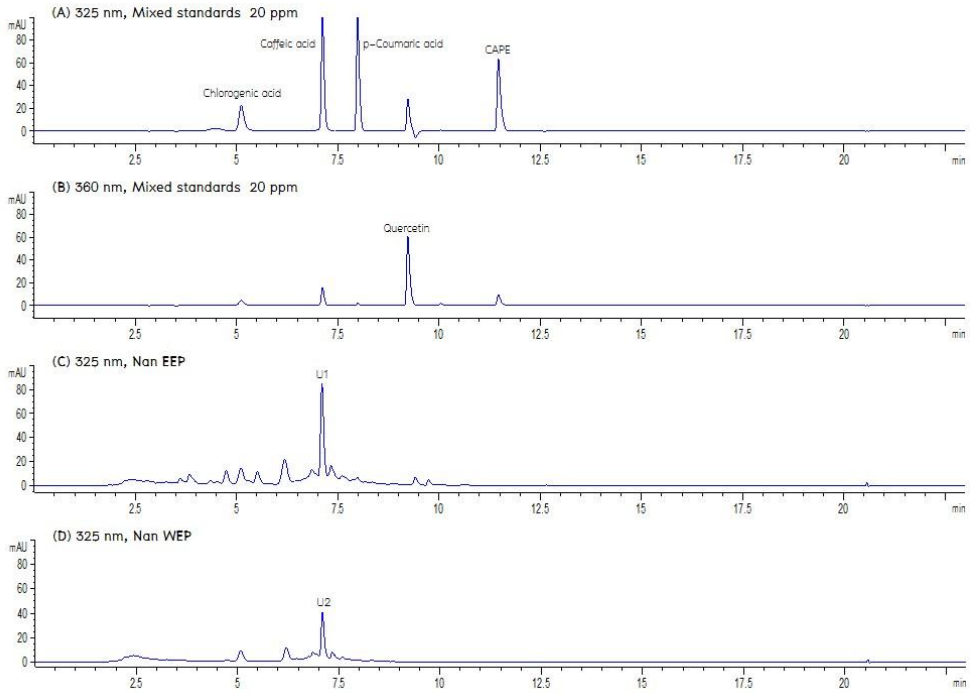
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay โดยใช้สารสกัดพรอพอลิส EEP และ WEP ความเข้มข้น 25–500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสองสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ สังเกตจากสีม่วงที่จางลงของสารละลาย DPPH และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสองเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ดังภาพที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดพรอพอลิส EEP และ WEP ที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า สารสกัดพรอพอลิส EEP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดพรอพอลิส WEP และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นสารควบคุมเชิงบวกในการเปรียบเทียบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ แสดงฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด (93.08%) และคำนวณหาค่า IC_{50} ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลง 50% โดยค่า IC_{50} ที่มีค่าน้อย จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดเอทานอล (EEP) และสารสกัดน้ำ (WEP) มีค่า 78.85 และ 246.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารสกัด EEP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัด WEP ประมาณ 3 เท่า เนื่องจากสารสกัด EEP มีสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ



ภาพที่ 2 การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ด้วยสารสกัดเอทานอล (EEP) สารสกัดน้ำ (WEP) และกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, AA)

4. การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิส ด้วยเทคนิค HPLC–DAD

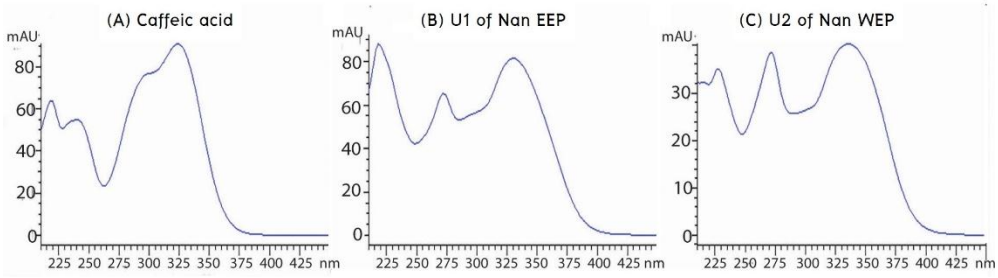
การวิเคราะห์ปริมาณกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เควอซิติน และ CAPE ในสารสกัดพรอพอลิส ด้วยเทคนิค HPLC–DAD โดยกรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก และ CAPE ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร และเควอซิตินตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร เตรียมสารละลายมาตรฐานผสม ความเข้มข้น 10–80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานผสม ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 3(A) (ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร) และภาพที่ 3(B) (ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร) และได้ข้อมูลจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ดังตารางที่ 2



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของ; A = สารละลายมาตรฐานผสม 20 ppm ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร B = สารละลายมาตรฐานผสม 20 ppm ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร C = สารสกัดเอทานอล (EEP) ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร และ D = สารสกัดน้ำ (WEP) ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน 5 ชนิด

สารมาตรฐาน	เวลา (นาที)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	สมการเส้นตรง	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)
กรดคลอโรจีนิก	5.1	325	y = 11.278x–11.015	0.9997
กรดคาเฟอิก	7.1	325	y = 26.042x+6.0344	1
กรดพาราคูมาริก	7.9	325	y = 25.525x+10.124	1
เควอซิติน	9.2	360	y = 17.008x+2.2292	1
CAPE	11.4	325	y = 19.672x+1.6304	1



ภาพที่ 4 สเปคตรัมของสาร; A คือ สารมาตรฐานกรดคาเฟอิก, B คือ U1 ของสารสกัดเอทานอล และ C คือ U2 ของสารสกัดน้ำ

ทำการวิเคราะห์สารสกัดพรอพอลิส 2 ตัวอย่าง คือ สารสกัดเอทานอล (EEP) และสารสกัดน้ำ (WEP) ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้โครมาโทแกรมที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร ดังภาพที่ 3(C) (EEP) และภาพที่ 3(D) (WEP) ตามลำดับ การบ่งชี้ชนิดของสารในแต่ละพีค โดยการเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ร่วมกับลักษณะสเปคตรัมของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดพรอพอลิสทั้งสองปรากฏพีคของสารประกอบหลัก (Major compound) คือ U1 (unknown1) และ U2 (unknown2) ที่เวลา 7.1 นาที แม้จะมีค่ารีเทนชันไทม์ (Retention time) ตรงกับสารมาตรฐานของกรดคาเฟอิก แต่เมื่อเปรียบเทียบสเปคตรัมของสารมาตรฐานกรดคาเฟอิก U1 และ U2 ดังภาพที่ 4 พบว่า สเปคตรัมของ U1 (ภาพที่ 4(B)) และ U2 (ภาพที่ 4(C)) คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างไปจากสารมาตรฐานกรดคาเฟอิก (ภาพที่ 4(A)) ดังนั้นพีค U1 และ U2 น่าจะเป็นกรดฟีนอลิกชนิดอื่น และเป็นไปได้ว่าในสารสกัดทั้งสองอาจจะมีกรดคาเฟอิกซ้อนทับกับพีคของ U1 และ U2 อยู่ด้วย และจากผลการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบพีคของสารตัวอย่างในตำแหน่งต่างๆ เทียบกับสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด ตรวจไม่พบ กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เควอซิติน และ CAPE ในสารสกัดพรอพอลิสทั้งสองชนิด

อภิปรายผล

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดพรอพอลิส พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอล (EEP) มีค่าสูงกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun et al. (2015) และ Usman et al. (2016) ที่ศึกษาพรอพอลิสจากประเทศจีนและมาเลเซีย ตามลำดับ พบว่า พรอพอลิสที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์สูงกว่าพรอพอลิสที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก

สารสำคัญดังกล่าวและเอทานอล 70 %v/v ที่ใช้ในการสกัด มีสภาพขั้วใกล้เคียงกันจึงสกัดสารสำคัญออกมาได้ดี

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่า สารสกัดเอทานอล (EEP) มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ คือ สารสกัดเอทานอล (EEP) พบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) จึงส่งผลให้สารสกัดเอทานอล (EEP) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ (Kumazawa et al., 2004) เกิดเป็นสารที่เสถียร จึงสามารถยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun et al. (2015) ที่ศึกษาพรอพอลิสจากประเทศจีน และ Usman et al. (2016) ที่ศึกษาพรอพอลิสจากประเทศมาเลเซีย พบว่า สารสกัดเอทานอล (EEP) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดน้ำ (WEP)

การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิสด้วยเทคนิค HPLC–DAD ได้ว่าสารสกัดพรอพอลิสทั้งสองชนิด (EEP และ WEP) ตรวจไม่พบ กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เควอซิติน และ CAPE ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumazawa et al. (2004) ที่เก็บรวบรวมพรอพอลิสจากประเทศต่างๆ รวมถึงประเทศไทยด้วย นำมาสกัดด้วยเอทานอลและวิเคราะห์องค์ประกอบของพรอพอลิส ด้วยเทคนิค HPLC โดยวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก 17 ชนิด ซึ่งรวมถึงกรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เควอซิติน และ CAPE ด้วย จากการวิเคราะห์ พบว่า พรอพอลิสของไทยตรวจไม่พบสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 17 ชนิด และไม่มีพีคของสารใดในโครมาโทแกรม แต่ในงานวิจัยนี้พบพีคของสารประกอบหลักที่เวลา 7.1 นาที และพีคในตำแหน่งอื่นๆ อีกด้วย อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยของ Siripatrawan et al. (2013) สกัดพรอพอลิสด้วยเอทานอล 30–70% และวิเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ 8 ชนิด คือ รูติน เควอซิติน นารินจีนิน แคมพ์เฟอรอล ไบคาลิน ไครซิน อะคาซิติน และกาแลนจิน ด้วยเทคนิค HPLC–DAD พบว่า รูติน เควอซิติน และนารินจีนินเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในตัวอย่างพรอพอลิสของไทย สำหรับความแตกต่างของพืชพรรณที่เป็นต้นกำเนิดของพรอพอลิส มีการศึกษาพบว่า ในยุโรปผึ้งเก็บยางมาจากต้น *Populus nigra* และสร้างเป็นพรอพอลิสชนิด Poplar type (Bankova et al., 2002) พรอพอลิสของประเทศบราซิลมาจากใบของพืช *Baccharis dracunculifolia* (Kumazawa et al., 2003) พรอพอลิสในแต่ละประเทศมีสารสำคัญแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชในแต่ละพื้นที่ที่มีการเลี้ยงผึ้ง (Burdock et al., 1998) พรอพอลิสของไทยไม่ได้ถูกสร้างจากพืชชนิด Poplar type เหมือนกับในยุโรป แต่มีรายงานว่าในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด

เชียงราย ลำพูน น่าน พะเยา และแพร่ มีต้นมะม่วงเป็นแหล่งของพรอพอลิส และมีสารสำคัญหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ เช่น คาร์ดอล คาร์ดานอล สารประกอบไตรเทอร์พีน (Sanpa et al., 2017)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดเอทานอล (EEP) และสารสกัดน้ำ (WEP) ของพรอพอลิส (ภาพที่ 3(C) และ 3(D)) พบว่า เอทานอลสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ ได้มากกว่าน้ำ โดยดูจากจำนวนพีคที่ตรวจวัดได้ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดพรอพอลิสจากเมืองปักกิ่ง ประเทศจีนของ Sun et al. (2015) ที่ตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก 28 ชนิด ในสารสกัดเอทานอล 75% ในขณะที่ตรวจพบสารประกอบฟีนอลิก 15 ชนิดในสารสกัดน้ำ และยังพบว่าเอทานอลสามารถสกัดปริมาณสารได้มากกว่าน้ำ โดยดูจากพื้นที่ใต้พีค น่าจะเป็นเพราะสารประกอบฟีนอลิกที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย กรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์และสารอนุพันธ์ซึ่งมีวงแหวนเบนซีนอยู่ในสูตรโครงสร้าง จึงละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วสูง เช่น เมทานอล เอทานอล แต่ละลายได้น้อยในน้ำ หรือกล่าวได้ว่าสารดังกล่าวมีสภาพขั้ว (Polarity) ใกล้เคียงกับเอทานอล 70%v/v จึงละลายในเอทานอล 70%v/v ได้ดีกว่าน้ำ เราจึงมักจะพบว่าการสกัดพรอพอลิสส่วนใหญ่นิยมใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวสกัด และผลการทดลองนี้ (ภาพที่ 3(C)) และภาพที่ 3(D)) ยังสนับสนุนผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอล (EEP) ที่วิเคราะห์ได้มากกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) อีกด้วย จากการศึกษาสารสกัดพรอพอลิสทั้งสองชนิดจากจังหวัดน่าน พบสารประกอบหลักที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ มีค่ารีเทนชันไทม์ 7.1 นาที จึงจะทำการศึกษาเพื่อบ่งชี้ชนิดและปริมาณของสารดังกล่าวในอนาคต ซึ่งอาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญและนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสารสกัดพรอพอลิสจากจังหวัดน่านด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70% และน้ำ พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอล (EEP) มีค่าสูงกว่าสารสกัดน้ำ (WEP) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลที่มีมากกว่าสารสกัดน้ำ การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดพรอพอลิส ด้วยเทคนิค HPLC–DAD ได้ว่าสารสกัดพรอพอลิสทั้งสองชนิด ตรวจไม่พบ กรดคลอโรจีนิก กรดคาเฟอิก กรดพาราคูมาริก เควอซิติน และ CAPE แต่พบสารประกอบหลักที่มีค่ารีเทนชันไทม์ 7.1 นาที ซึ่งอาจจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจและนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ จึงมีแผนจะทำการศึกษาเพื่อบ่งชี้ชนิดและปริมาณของสารดังกล่าวในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย เรื่อง “การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร Caffeic acid phenethyl ester : CAPE ในสารสกัดพรอพอลิสและฤทธิ์ในการเป็นสารโปรออกซิแดนท์และแอนตี้ออกซิแดนท์” ซึ่งได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

เอกสารอ้างอิง

ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย. (2551). พรอพอลิส: ของขวัญจากธรรมชาติ. **ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ, 3**(2), 286–295.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., & Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90**(17), 7915–7922.

Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A.G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift für Naturforschung, 57c**, 530–533.

Banskota, A.H., Nagaoka, T., Sumioka, L.Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology, 80**(1), 67–73.

Boonsai, P., Phuwapraisirisan, P., & Chanchao, C. (2014). Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. **International Journal of Medical Sciences, 11**(4), 327–336.

Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology, 36**(4), 347–363.

Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis, 10**, 178–182.

Easton–Calabria, A., Demary, K.C., & Oner, N.J. (2019). Beyond pollination: Honey Bees (*Apis mellifera*) as zootherapy keystone species. **Frontiers in Ecology and Evolution, 6**, 161.

Khacha–ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., & Tragoolpua, Y. (2013). Antioxidant and anti–cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 14**(11), 6991–6995.

Khacha–ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., & Tragoolpua, Y. (2016). Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress cancer cell growth through induction of apoptosis pathways. **Investigational New Drugs, 34**(6), 707–722.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry, 84**(3), 329–339.

Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2003). Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 51**(6), 740–742.

Nagaoka, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2003). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): potent nitric oxide inhibitor from the Netherlands propolis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin, 26**(4), 487–91.

Nair, P., Malhotra, A., & Dhawan, D.K. (2015). Curcumin and quercetin trigger apoptosis during benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry, 400**, 51–56.

Sanpa, S., Popova, M., Tunkasiri, T., Eitssayeam, S., Bankova, V., & Chantawannakul, P. (2017). Chemical profiles and antimicrobial activities of Thai propolis collected from *Apis mellifera*. **Chaing Mai Journal of Science, 44**(2), 438–448.

Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela–Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology, 299**, 152–178.

Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W., & Sanguandeekul, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology, 48**(1), 22–27.

Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., & Zhang, H. (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence–Based Complementary and Alternative Medicine, 2015**, 1–9.

Tiveron, A.P., Rosalen, P.L., Franchin, M., Lacerda, R.C.C., Bueno–Silva, B., Benso, B., Denny, C., Ikegaki, M., & Alencar, S.M. (2016). Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti–inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. **PLoS One, 11**, 1–18.

Usman, U.Z., Bakar, A.B.A., & Mohamed, M. (2016). Phytochemical screening and comparison of antioxidant activity of water and ethanol extract propolis from Malaysia. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 8**(5), 413–415.

Widjaja, A., Yeh, T.H., & Ju, Y.H. (2008). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 39**, 413–418.

Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., & Ratajczak, I. (2019). The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. **Brazilian Journal of Pharmacognosy, 29**, 301–308.